FACULTÉ DE MÉDECINE DE L'UNIVERSITÉ DE NANCY

1917-1918 2e Série N° 75

LA RÉACTION DE L'INDOL

DANS LA PRATIQUE BACTÉRIOLOGIQUE

APPLICATION A LA RECHERCHE DU COLIBACILLE DANS LES EAUX

THÈSE

Présentée et soutenue publiquement, le Jeudi 2 Mai 1918

POUR OBTENIR LE GRADE DE

DOCTEUR EN MÉDECINE

PAR

ZUBER (RAOUL)

Chef des Travaux d'Hygiène et de Bactériologie à la Faculté de Médecine
Préparateur à l'Institut Sérothérapique
de l'Université de Nancy
Chef du Laboratoire de Bactériologie de la Place de Cannes

NÉ LE 17 JANVIER 1885, A VIREUX-MOLHAIN (ARDENNES)

EXAMINATEURS DE LA THÈSE :

MACÉ, Professeur . . . . *Président.*
ÉTIENNE, Professeur. . .
MICHEL, Agrégé . . . . *Juges.*
FAIRISE, Agrégé. . . . .

Le Candidat répondra aux questions qui lui seront faites sur les diverses parties de l'enseignement médical.

NANCY

IMPRIMERIE LORRAINE, RIGOT ET Cie

1918

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41547202_0055

FACULTÉ DE MÉDECINE DE L'UNIVERSITÉ DE NANCY

1917-1918 — 2e Série — N° 75

LA RÉACTION DE L'INDOL

DANS LA PRATIQUE BACTÉRIOLOGIQUE

APPLICATION A LA RECHERCHE DU COLIBACILLE DANS LES EAUX

THÈSE

Présentée et soutenue publiquement, le Jeudi 2 Mai 1918

R. UNIV. BIBLIOTHEEK LEIDEN

POUR OBTENIR LE GRADE DE

DOCTEUR EN MÉDECINE

PAR

ZUBER (RAOUL)

Chef des Travaux d'Hygiène et de Bactériologie à la Faculté de Médecine
Préparateur à l'Institut Sérothérapique
de l'Université de Nancy
Chef du Laboratoire de Bactériologie de la Place de Cannes

NÉ LE 17 JANVIER 1885, A VIREUX-MOLHAIN (ARDENNES)

EXAMINATEURS DE LA THÈSE :

MACÉ, Professeur . . . . *Président.*
ÉTIENNE, Professeur. . .
MICHEL, Agrégé . . . . *Juges.*
FAIRISE, Agrégé. . . . .

Le Candidat répondra aux questions qui lui seront faites sur les diverses parties de l'enseignement médical.

NANCY

IMPRIMERIE LORRAINE, RIGOT ET Cie

1918

FACULTÉ DE MEDECINE DE L'UNIVERSITE DE NANCY

Doyen : M. MEYER, ✲, I ✪.
Assesseur : M. WEISS, O ✲, I ✪.
Doyen honoraire : M. F. GROSS, O ✲, I ✪
Professeurs honoraires: MM. BEAUNIS, ✲, I ✪ ; NICOLAS, I ✪ ; PRENANT, ✲, I ✪
BERNHEIM, O ✲, I ✪ ; F. GROSS, O ✲, I ✪

Professeurs

Médecine opératoire	M. CHRÉTIEN, I ✪.
Clinique chirurgicale	M. WEISS, O ✲, I ✪.
Chimie médicale et Toxicologie	M. GARNIER, I ✪.
Clinique obstétricale et Accouchements.	M. A. HERRGOTT, ✲, I ✪.
Hygiène	M. MACÉ, I ✪.
Physiologie	M. MEYER, ✲, I ✪.
Clinique médicale	M. SIMON, I ✪.
Histoire naturelle médicale	M. VUILLEMIN, I ✪.
Clinique ophtalmologique	M. ROHMER, I ✪.
Médecine légale	M. P. PARISOT, ✲, I ✪.
Clinique des maladies des enfants	M. HAUSHALTER, ✲, I ✪.
Histologie	M. BOUIN, I ✪.
Anatomie descriptive	M. ANGEL, I ✪.
Anatomie pathologique	M. HOCHE, I ✪.
Clinique médicale	M. ETIENNE, I ✪.
Clinique chirurgicale	M. VAUTRIN, ✲, I ✪.
Pathologie interne et Pathologie générale.	M. N...
Physique médicale	M. N...

Chargés de Cours complémentaires :

Cliniq. de chir. infantile et orthopédie.	M. FRŒLICH, ✲, I ✪, agrégé libre.
Clinique des voies urinaires	M. ANDRÉ, ✲, I ✪, agrégé libre.
Clinique d'oto-rhino-laryngologie	M. JACQUES, I ✪, agrégé libre.
Clinique des malad. syphilit. et cutanées.	M. L. SPILLMANN, I ✪, agrégé libre.
Médecine opératoire	M. MICHEL, I ✪, agrégé libre.
Clinique chirurgicale élémentaire (1)	M. MICHEL, I ✪, agrégé libre.
Clinique des maladies mentales	M PARIS. I ✪.
Clinique des maladies des vieillards	M. RICHON, I ✪, agrégé.
Accouchements	M. FRUHINSHOLZ, I ✪, agrégé.
Clinique des maladies tuberculeuses (1).	M. PERRIN, A ✪, agrégé.
Clinique des maladies tuberculeuses (1).	M. J. PARISOT, ✲, A ✪, agrégé.
Pathologie externe	M. MICHEL, I ✪, agrégé libre.
Thérapeutique et Matière médicale	M N...
Clinique médicale élémentaire (1)	M. N...
Clinique d'électrothérapie	M. N...

Agrégés en exercice :

MM.	MM.	MM.
LAMBERT, I ✪.	COLLIN, A ✪.	BINET, A ✪.
RICHON, ✲, I ✪.	SENCERT, ✲, I ✪.	PERRIN, A ✪.
G. GROSS, ✲, I ✪.	ROBERT, I ✪.	THIRY, I ✪.
FRUHINSHOLZ, I ✪.	BUSQUET, A ✪.	FAIRISE, A ✪.
	LUCIEN, ✲, A ✪	J. PARISOT, ✲, A ✪.

Agrégés libres

MM. REMY, A ✪, FÉVRIER, O ✲, I ✪, FRŒLICH, ✲, I ✪
JACQUES, I ✪, ANDRÉ, ✲, I ✪, MICHEL, I ✪, L. SPILLMANN, I ✪.

M. H. COIFFARD, I ✪, Secrétaire.

(1) Fondation de l'Université.

La Faculté a arrêté que les opinions émises dans les dissertations qui lui sont présentées, doivent être considérées comme propres à leurs auteurs, et qu'elle n'entend ni les approuver ni les improuver.

A MON MAITRE

MONSIEUR LE PROFESSEUR MACÉ

Professeur d'Hygiène à la Faculté de Médecine
Directeur de l'Institut Sérothérapique de l'Est
Inspecteur du Service Départemental d'Hygiène
Membre du Conseil Supérieur d'Hygiène publique de France

Hommage de profonde gratitude et d'affectueuse reconnaissance pour sa grande bonté à mon égard et les précieux conseils qu'il ne m'a jamais ménagés depuis que j'ai l'honneur d'être son assistant au Laboratoire d'Hygiène de la Faculté de Médecine.

A Monsieur le Professeur G. ÉTIENNE

Professeur de Clinique Médicale à la Faculté de Médecine

En témoignage de profonde reconnaissance pour l'intérêt qu'il m'a toujours marqué et le dévouement dont il a fait preuve à mon égard lors de circonstances bien douloureuses.

AVANT-PROPOS

Ce modeste travail n'est qu'un chapitre isolé d'une étude beaucoup plus étendue, traitant de la recherche du colibacille dans les eaux, étude qui nous avait été inspirée par M. le Professeur Macé, mais que les événements actuels nous ont empêché de mettre entièrement au point et que nous nous réservons de publier dès que les circonstances nous permettront de terminer nos recherches.

Tel quel, ce fragment isolé constitue cependant une mise au point à l'heure actuelle de la question de la réaction de l'indol dans ses applications pratiques à la recherche du colibacille dans les eaux, et nous supposons qu'à ce titre il rendra service à ceux que le sujet intéresse, en particulier aux bactériologistes qui ont à s'occuper d'analyses d'eaux.

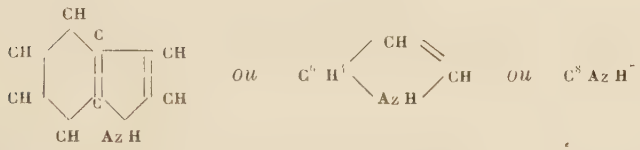
Nous nous sommes placé à un point de vue exclusivement pratique, nous écartant en cela de la plupart des auteurs qui ont traité de la question de l'indol et dont les observations, très justes en théorie, il faut le reconnaître, s'appliquent plutôt à l'étude spécifique des bactéries qu'à la recherche courante d'une propriété fondamentale de certaines espèces.

Après quelques généralités sur l'indol et les modalités de sa formation aux dépens des milieux de cultures, nous faisons un court exposé des principales méthodes permettant de déceler la présence de ce corps, puis étudions la fonction indologène des bactéries, et recherchons la meilleure manière de la mettre pratiquement en évidence, en considérant que nos conclusions s'appliquent surtout à la recherche du colibacille dans les eaux.

Or, le bactériologiste qui s'occupe d'analyses d'eaux a, en général, à pratiquer cette recherche sur un grand nombre d'échantillons; il lui est par conséquent absolument nécessaire, pour ne pas perdre de temps, d'avoir à sa disposition un procédé absolument pratique, donnant aussi rapidement que possible le maximum de certitude avec le minimum de manipulations.

GÉNÉRALITÉS SUR L'INDOL

L'indol, qui a pour formule chimique :



est un pyrrol correspondant au naphtalène.

Il cristallise en grandes lamelles incolores, brillantes, fondant à 52°, d'odeur fécaloïde caractéristique, volatiles à 245°, bien qu'entraînées par la vapeur d'eau à 100°, peu solubles dans l'eau, solubles dans l'alcool et l'éther. La solution aqueuse d'indol donne, avec l'acide chromique, un précipité brun violacé foncé, puis vert ; avec l'acide azoteux ($HAzO^3$ fumant ou $AzO^2K + HCL$), une coloration rouge due à la formation de nitrate de nitroso-indol : AzO^3H, $C^{16}H^{13}$ (AzO^2) Az^2, qui cristallise en fines aiguilles rouges peu solubles dans l'eau (1).

(1) Dr L. Garnier. *Chimie médicale*, p. 352,

L'hydrogène de l'indol peut être remplacé par des groupes méthyles pour donner des indols substitués, parmi lesquels le β *méthylindol* ou *scatol*, cristallisant en feuillets brillants d'odeur fécale pénétrante. On connaît également des acides indolcarboniques (1).

Au point de vue biologique, l'indol est un des produits ultimes de décomposition des matières protéiques animales ou végétales. Il se forme en particulier dans l'intestin (odeur des fèces), à côté de son homologue le scatol, comme terme constant de la putréfaction des matières albuminoïdes dans la troisième phase de la digestion pancréatique. Concurremment à cette digestion pancréatique, il y a dans l'intestin formation d'indol par suite de l'action de certains microbes (bacille coli et bacille proteus, par exemple), sur les produits de la digestion; et l'on peut affirmer que le colibacille est le grand agent de cette formation intestinale d'indol. De même, c'est à lui qu'il faut rapporter la production de l'indican urinaire ou indoxylsulfonate de potasse, C^8H^6AzO, SO^3K, qui est un dérivé sulfonique et potassique de l'indoxyle, isomère de l'oxindol C^8H^7AzO. Il constitue une substance de déchet résultant de l'activité vitale de ces mêmes microbes, substance élaborée aux dépens des matériaux nutritifs albuminoïdes que renferment les milieux de culture habituels.

Comme il a été dit plus haut, l'indol est un produit volatil peu soluble dans l'eau, mais par contre très soluble

(1) Troost et Péchard. *Traité de chimie élémentaire*, p. 842.

dans l'éther; il est, de même, très soluble dans le chloroforme, le benzol, l'alcool amylique, etc.

Cette grande solubilité dans les produits précédents a été utilisée pour mettre en évidence et même doser l'indol dans les bouillons de culture où sa présence peut servir à la diagnose des espèces qui ont cultivé.

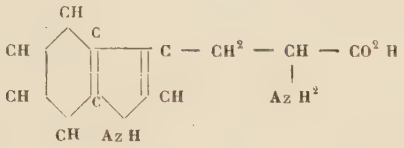
LA PRODUCTION D'INDOL

Influence du milieu.-Variations avec les différentes peptones. Milieux chimiquement définis. - Indol et tryptophane. Influence de l'aération et de la température.

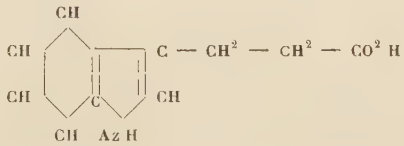
Toutes les matières protéiques ne peuvent, sous l'influence d'une action microbienne déterminée, donner naissance à de l'indol. Il est nécessaire pour cela qu'elles renferment dans leur molécule des corps indologènes, et surtout du tryptophane. Par suite de l'attaque de telles matières albuminoïdes par les ferments protéolytiques du tube digestif ou par certains microbes, le tryptophane se transforme, ainsi que l'ont prouvé Porcher et Nicolas (1), en acide indol-acétique et acide indol-carbonique qui, en perdant chacun une molécule CO^2 donnent l'un du *scatol*, l'autre de l'indol, comme le montre le tableau ci-contre.

(1) Porcher et Nicolas. *Cours de chimie organique et biologique* (2e édition), p. 442.

Le tryptophane

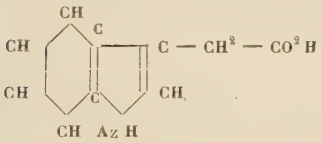


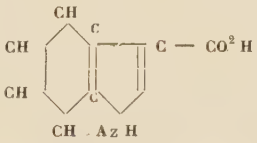
en perdant une molécule AzH^2 donne *l'acide indol-propionique*



qui se transforme à son tour, suivant qu'il abandonne une ou deux molécules CH^2, en

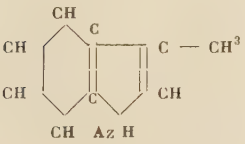
acide indol-acétique ou *acide indol-carbonique*,

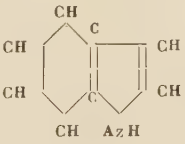




lesquels en perdant une molécule CO^2 donnent respectivement :

le scatol et *l'indol*





La recherche de la production d'indol ne devra donc s'effectuer que dans les milieux à base de tryptophane; c'est le cas des milieux peptonés. Encore convient-il d'employer de préférence les peptones pancréatiques dans lesquelles la trypsine libère presque totalement le tryptophane que les microbes peuvent alors attaquer plus facilement.

Mais il est des peptones qui contiennent de l'indol; il importe donc de vérifier auparavant que celles que l'on emploiera en sont absolument exemptes.

Nous n'avons eu qu'à nous louer, sous ce rapport, des peptones Chapoteaux, Collas et Chenal-Douillet, employées au Laboratoire d'hygiène de la Faculté de Médecine de Nancy. M. le Professeur Macé, qui les utilise depuis fort longtemps pour la recherche du colibacille dans les eaux, n'a jamais constaté la présence de l'indol dans ces peptones.

La plupart des maisons fabriquent d'ailleurs actuellement des marques de peptones spéciales pour la bactériologie et ne contenant aucune trace d'indol et, malgré les grandes variations des marques commerciales sur lesquelles Gorini (1) attirait l'attention récemment encore, ces différences ne peuvent apporter de causes d'erreur dans le diagnostic bactériologique.

L. Gauthier (2), qui s'est beaucoup occupé de la question, prétend, après Sicre, puis Porcher, avoir trouvé de

---

(1) Constantino Gorini. Circa l'influenza della qualita del peptone sulle funzione batteriche. *Policlinico*, 1916.

(2) Louis Gauthier. Recherches sur l'indol en microbiologie. Thèse pharmacie, Lyon 1912.

l'indol dans la plupart des peptones qu'il a essayées. Ceci est possible, d'autant plus que la fabrication d'une même firme peut varier d'un jour à l'autre et qu'il est très rare, même avec la même marque, d'obtenir absolument le même produit à deux moments différents.

Grimbert (1) avait montré depuis longtemps déjà que les milieux peptonés ne sont pas toujours identiques à eux-mêmes, car on constate une grande variabilité dans la composition des peptones.

D'ailleurs, la quantité d'indol renfermée dans les peptones de bonnes marques est toujours extrêmement faible. « Aussi, dit Porcher, peut-elle échapper à l'observateur s'il ne prend pas la précaution de concentrer l'extrait éthéré obtenu dans cette recherche. »

Quoi qu'il en soit, ces traces d'indol que l'on rencontre quelquefois dans les peptones ne pourraient induire en erreur que s'il s'agissait de doser quantitativement l'indol dans une culture. Dans la pratique bactériologique courante, où l'on se contente de le rechercher qualitativement, les traces infinitésimales d'indol que contiennent parfois les peptones et qui ne sont pas décelées par les méthodes ordinaires, ne pourraient en aucune façon entacher d'erreur les résultats obtenus. Il suffira de vérifier au moment de la recherche ou de la préparation des bouillons que la solution de peptone avant culture ne donne pas de réaction d'indol apparente dans les conditions mises en œuvre.

Ceci établi, quel milieu faudra-t-il employer pour avoir avec un microbe donné une production d'indol maximum ?

---

(1) L. Grimbert. De l'unification des méthodes de culture en bactériologie. *Archives de parasitologie*, t. I, n° 2, p. 191 à 198.

La bouillie de viande et le bouillon de viande ne donnent que de médiocres résultats; l'addition à ces milieux d'une peptone provenant d'un protéique tryptophanique donnera évidemment une production d'indol plus intense et plus rapide, puisque c'est aux dépens du tryptophane que se forme l'indol; c'est ce qu'on observe lorsqu'on emploie le bouillon de viande peptoné. La simple solution de peptone dans l'eau donnera aussi des résultats très favorables. Quelques auteurs ont imaginé d'ajouter à cette eau peptonée des sels variés; mais il ne semble pas qu'il y ait avantage à cela.

D'après Grimbert (1), le milieu le plus favorable est la simple solution de peptone à 3 % neutralisée. L. Gauthier (2) arrive à la même conclusion après de nombreux essais tentés sur des solutions de peptone, auxquelles il ajoute des sels variables : phosphate de soude, sulfate de magnésie, chlorure de sodium, nitrite de potassium, etc.

Au contraire, Selter (3) affirme que pour mettre l'indol en évidence, il n'est rien de supérieur à une solution de peptone très riche (10 %) additionnée de 0,5 % de phosphate de sodium et de 0,1 % de sulfate de magnésie. Avec ce procédé, l'auteur prétend que le bacille typhique même donne un peu d'indol, mais à condition d'opérer sur une très grande quantité de culture.

Comment expliquer les résultats contradictoires obtenus

---

(1) Grimbert. Diagnostic des bactéries par leurs fonctions biochimiques. *Archives de parasitologie*, 7, n° 2, p. 237, 1903.

(2) L. Gauthier. Recherches sur l'indol en microbiologie. Thèse pharmacie, Lyon 1912.

(3) Selter. Ueber Indolbildung durch Bakterien. *Centralbl. f. Bakter.* I, Orig. t. LI, 25 sept. 1909, p. 465-476.

par les différents auteurs précités ? La teneur en peptone a évidemment une certaine importance au point de vue de la réaction : nous avons fait toute une série d'essais avec des milieux contenant des taux variables de peptones (1 à 12 %). Pour la plupart des microbes étudiés, et en particulier pour le colibacille, c'est le chiffre de 4 % qui nous a donné les meilleurs résultats ; au-dessous de ce taux, il n'apparaît que de petites quantités d'indol progressivement croissantes jusqu'au taux de 4 % de peptone ; puis, au-dessus, on ne constate plus de changement. Il est donc inutile de forcer au delà de 4 % la teneur en peptone des milieux utilisés et les résultats de Selter cités plus haut s'expliquent très bien par ce fait qu'opérant sur de grandes quantités de milieu peptoné à 10 %, il a simplement accumulé, jusqu'à les mettre facilement en évidence, les quantités infinitésimales d'indol contenues dans les peptones qu'il employait. Ses données sont sujettes à caution et il faudrait bien se garder de conclure avec lui que le bacille d'Eberth peut, dans certaines conditions, devenir producteur d'indol.

Le milieu usuel le plus favorable à la solution d'indol par les bactéries sera donc la simple solution d'eau peptonée à 4 %, puisque c'est à la décomposition du tryptophane contenu dans la peptone du milieu, qu'est due la production d'indol. Les mêmes microbes qui la causent n'attaquent pas les albumines naturelles pures avec lesquelles elles ne donnent ni indol, ni phénol (1).

---

(1) Dobrowlski. Des microbes producteurs de phénol. *Ann. Inst. Pasteur*, t. XXIV, p. 594, juillet 1910.

Avec notre Maître, M. Macé, nous pensons que cette recherche d'indol peut se faire tout aussi bien dans les bouillons de culture mêmes, bouillons peptonisés ordinaires ou bouillons acidifiés employés pour la diagnose de certaines espèces. Elle peut, en particulier, être faite directement sur les bouillons phéniqués ayant servi à l'ensemencement des eaux pour la recherche du colibacille; la présence de l'acide phénique ne gêne en rien la réaction qui d'ailleurs n'apparaîtrait pas en milieu fortement alcalin.

Tel n'est pas l'avis de A. Berthelot qui, dans un travail (1) très intéressant, qui constitue une mise au point de la question, rappelle aux bactériologistes le conseil donné par Porcher et Panisset (2), de ne jamais caractériser un corps tel que l'indol directement dans une culture microbienne. Ces auteurs, écrit-il, « ont établi en effet, que dans les cultures microbiennes, même d'espèces ne donnant pas d'indol, peuvent se former certaines substances, qui ont comme caractère commun de se décomposer facilement en donnant de l'indol; or, l'une d'elles, l'acide indolcarbonique, se dissocie même lorsqu'on porte simplement sa solution aqueuse à l'ébullition. La présence de tels composés indologènes rend donc illusoire la précaution que l'on prenait de distiller les cultures et, pour extraire l'indol qui peut se trouver dans celles-ci, il appa-

(1) Albert Berthelot. Recherches sur le Proteus Vulgaris. *Annales de l'Institut Pasteur*, t. XXVIII, 1914, p. 839.

(2) Ch. Porcher et L. Panisset. 1° Recherche de l'indol dans les bouillons microbiens. Comptes rendus de la Société de biologie, 24 août 1909 ; 2° des composés indologènes dans les cultures liquides. Comptes rendus de l'Académie des sciences, 17 mai 1909.

raît indispensable d'avoir recours à d'autres procédés qu'à l'entraînement par la vapeur d'eau. Celui qui convient le mieux est certainement l'épuisement des liquides à analyser par l'éther convenablement purifié. »

Berthelot a certainement raison de s'élever contre les procédés défectueux de recherche d'indol qu'il signale, mais ses observations s'appliquent surtout à la méthode à la diméthylaminobenzaldéhyde, « qui donne avec diverses substances existant normalement dans la plupart des cultures microbiennes et même dans certains milieux stériles, des colorations très difficiles à distinguer de celles que produisent l'indol et le scatol. » Mais ces critiques, confirmées par un ouvrage récent de Miranda (1), n'ont plus la même valeur avec les autres procédés, et nous persistons à penser que la recherche de la réaction de l'indol peut se faire directement dans les bouillons de culture, à condition de se mettre par certaines expériences préalables, une fois pour toutes, à l'abri des causes d'erreur toujours possibles.

L'idéal serait évidemment d'utiliser un milieu chimiquement défini à base de tryptophane, corps qu'il était assez difficile, il y a quelques années à peine, de se procurer dans le commerce, et l'on devait se contenter de milieux moins favorables dans lesquels le microbe n'a qu'à attaquer une molécule azotée déjà simplifiée.

Cette idée fut mise en lumière presque simultanément

(1) Francisco Valle Miranda. Recherches biochimiques sur deux races de « Proteus Vulgaris ». Hauser, thèse sciences, Paris 1917.

par Seidelin et Frederick-C. Lewis (1), et par Berthelot (2). Ce dernier auteur, en particulier, dans un autre mémoire paru depuis (3), écrit textuellement : « Etant donné ce que l'on sait sur l'origine de l'indol qui se forme dans certaines cultures microbiennes, on conçoit sans peine que les microbes capables d'attaquer le tryptophane, de quelque manière que ce soit, manifesteront beaucoup mieux leur action lorsqu'ils se trouveront directement en présence de cet acide aminé libre et qu'ils n'auront pas à le séparer d'un édifice moléculaire le plus souvent très complexe. Comme l'on sait que le meilleur procédé de préparation du tryptophane consiste dans la digestion tryptique, aseptique et prolongée de matières albuminoïdes convenablement choisies, on doit donc, pour préparer les milieux destinés à l'étude de la fonction indologène, donner la préférence aux peptones pancréatiques, particulièrement à celle de la caséine. Toutefois, il vaut encore mieux employer des milieux de composition bien définie auxquels on incorpore du tryptophane. »

Partant de ce principe, Berthelot a préconisé pour l'étude de la fonction indologène des microbes plusieurs milieux au tryptophane, dont l'un chimiquement défini, renfermait avec 1,5 % de tryptophane, divers autres acides aminés et des sels.

---

(1) H. Seidelin et Frederick-C. Lewis. Some notes on indol-reaction and allied phenomena. *Journal of Hygiene*, décembre 1911.

(2) Albert Berthelot. Sur l'emploi de milieux chimiquement définis à base de tryptophane. Comptes rendus de la Société de biologie, 20 avril 1912, t. LXXII, p. 595.

(3) Albert Berthelot. Recherches sur le Proteus Vulgaris. *Annales de l'Institut Pasteur*, t. XXVIII, 1914, p. 839.

A. Distaso (1) a préconisé, pour la recherche de l'indol en bactériologie, un milieu de culture qui selon lui se comporte exactement, au point de vue de la réaction de l'indol, comme les milieux chimiquement définis à base de tryptophane.

Voici en quoi consiste son procédé :

On prépare les deux solutions suivantes, A et B :

A : extrait pancréatique obtenu par macération sous chloroforme et conservé dans un flacon après addition d'éther.

Le pouvoir tryptique de cette solution se conserve pendant plusieurs mois.

B : Sérum de bœuf ou de mouton bouilli en mélange avec son volume d'eau ordinaire.

On mélange 15 volumes de la solution A à 100 volumes de la solution B, on laisse digérer pendant une nuit à 60°, on filtre, on met en tubes et on stérilise à 120° pendant 15 minutes.

Par une série d'expériences, l'auteur prouve que ce milieu est absolument identique, au point de vue de la formation de l'indol, aux milieux à base de tryptophane.

D'ailleurs, l'utilisation du tryptophane varie avec les espèces, comme l'ont montré Herzfeld et Klinger (2) ; cette substance peut être décomposée non seulement productrice d'indol comme le colibacille et le vibrion cholérique,

(1) A. Distaso. La formation de l'indol dans le milieu sérum digéré et dilué. C. R., Soc. Biologie, t. LXXX, 3 mars 1917, p. 253.

(2) Herzfeld et R. Klinger. Quantitative Untersuchungen über den Indol- und Tryptophanumsatz der Bakterien. *Centralbl. f. Bakter.* I. Orig. t. LXXVI, f. 1, 14 mai 1915, p. 1.

mais aussi par des microbes ne donnant pas d'indol, comme le bacille typhique par exemple; cette utilisation du tryptophane cesse dès qu'on lui adjoint d'autres composés aminés tels que ceux que renferme le bouillon peptoné.

Il est beaucoup d'espèces qui exercent leur pouvoir peptolytique tandis que le colibacille et le proteus peuvent donner une augmentation de tryptophane. Enfin d'autres espèces, les bacilles typhique et paratyphique notamment, déterminent toujours une diminution de cette substance, car leurs propriétés peptolytiques sont tellement réduites que l'utilisation du tryptophane par elles dépasse sa production. A côté des bactéries qui ne donnent pas d'indol dans les milieux riches en tryptophane, il en est d'autres qui en mettent en liberté ; tels sont les bacilles diphtériques.

La présence de l'indol dans une culture exclut d'ailleurs, dans la plupart des cas, celle du tryptophane, et inversement, ainsi que l'a prouvé Pérépélizyn (1), en recherchant la présence du tryptophane dans les cultures de bactéries appartenant au groupe B. typhique et paratyphique et au groupe B. coli. Parfois cependant, on peut constater la présence simultanée de ces deux substances pour certaines variétés de B. coli, paracoli et cloacœ. Les bactéries du groupe B. typhique et paratyphique examinées, qui décomposaient la peptone avec formation de tryptophane, n'ont pas donné d'indol. Les bactéries du groupe

(1) N. Pérépélizyn. La réaction du tryptophane et son application en bactériologie. *Archives des sciences biologiques de Pétrograd*, t. XIX, n° 2, p. 139-151.

B. coli ne donnaient pas de tryptophane dans la plupart des cas, alors que l'indol apparaissait pendant les premières vingt-quatre heures après l'ensemencement.

Au reste, la désagrégation de la molécule tryptophane peut, au lieu d'aboutir à la formation d'indol, s'arrêter à la production d'acide indol-acétique ou d'acide indol-carbonique qu'on devrait toujours rechercher dans les cultures.

Si la présence de tryptophane facilite beaucoup la formation de l'indol, il faut noter, par contre, que certaines substances, en particulier les sucres, empêchent cette formation. Pour rechercher quels sont ces sucres inhibiteurs et quel est le mécanisme de cette inhibition, A. Fischer (1) utilise un milieu peptoné à 2 %, auquel il ajoute des quantités croissantes de différents sucres (maltose, lactose, glucose, galactose, fructose). L'indol est apprécié colorimétriquement par le procédé d'Ehrlich. Parmi tous les sucres examinés, seul le glucose empêche la formation d'indol; cette action empêchante se produit très régulièrement après 43 heures pour une concentration variant entre 1,8 et 2,25 %. Le lactose n'empêche pas la formation d'indol comme le fait le mélange de ses deux composants : galactose et glucose; il y a donc lieu de penser que le lactose est consommé directement par le B. coli, sans dédoublement préalable. Cette action inhibitrice caractéristique du glucose résulterait d'une inactivation par ce sucre du ferment protéolytique du B. coli.

---

(1) A. Fischer. Hemmung der Indolbildung bei Bakt Coli in Culturen sint Zuckerzusatz. *Biochem. Zeitschrifft*, t. LXX, 12 juillet 1915, p. 105-118.

Il est donc inutile de tenter la recherche de l'indol dans les milieux sucrés, et il sera nécessaire de s'assurer, avant de pratiquer la réaction, que la peptone employée est bien exempte de glucose.

La formation de l'indol dans les cultures ne se fait que progressivement, au fur et à mesure de l'attaque de la molécule albuminoïde; elle n'atteint son maximum qu'au bout d'un laps de temps relativement long et qui varie avec les microbes ensemencés (5 à 15 jours en moyenne, d'après nous; d'après Klieger (1) le jour optimum pour la réaction serait du 4e au 6e). Il y a donc intérêt à n'opérer la recherche de ce produit que tardivement, à partir du 4e ou 5e jour.

Une même culture peut donner une réaction négative après vingt-quatre heures, tandis qu'au bout de quelques jours la réaction devient positive.

Au fur et à mesure que les bactéries indologènes se multiplient, leur attaque sur le tryptophane devient plus intense, donc plus de déchets de la désagrégation albuminoïde; en particulier, plus d'indol. C'est d'ailleurs ce qui limite la vitalité de la culture; il arrive un moment où les produits élaborés, y compris l'indol, s'opposent au développement ultérieur des bactéries.

Dans bien des cas cependant, on peut observer une réaction très nette au bout de 12 à 24 heures, surtout si l'on emploie des procédés très sensibles. Porcher et Panis-

(1) I.-J. Klieger. Observations on indol production by bacteria of the Colon-typhoïd group. *Journ. of inf. dis*, t. XIV, janvier 1914, p. 81.

set (1), par la méthode de la diméthylaminobenzaldéhyde qui sera décrite plus loin, observent la présence d'indol dans des cultures de colibacille déjà une heure après l'ensemencement, mais en très faible quantité. Celle-ci va d'ailleurs en augmentant très rapidement, surtout entre la deuxième et la troisième heure. On pourrait donc tenter dès ce moment la réaction de l'indol qui, pour certaines cultures, serait déjà manifeste.

En particulier, si l'on pratique comme le fait le professeur Macé, la réaction de l'indol directement dans les bouillons phéniqués à 1,25 pour 1.000 ayant servi à l'ensemencement des eaux pour la recherche du colibacille, cette réaction, qui ne s'obtient pas après douze heures d'étuve à 42°, alors que le bouillon n'est pas encore troublé, devient tout à fait évidente après 16 heures ou plus, lorsque le bouillon phéniqué s'est troublé de façon appréciable. Le trouble en question, du reste, peut ne survenir qu'après 20, 24, même 30 heures d'étuve; exceptionnellement, il peut même tarder davantage, jusqu'à 48 heures, parfois trois jours. Dans tous ces cas, la réaction peut s'obtenir dès l'apparition d'un trouble net, lorsqu'il est dû au développement du colibacille.

Le procédé Macé, qui sera décrit plus loin, donne à ce moment déjà une belle coloration rouge carminée qui permet, dès la 16e heure après l'ensemencement, d'affirmer, par la présence du colibacille ou des autres espèces indologènes, une souillure fécaloïde de l'eau examinée.

(1) Porcher et Panisset. Sur la rapidité d'apparition de l'indol dans les cultures microbiennes. C. R. Soc. Biologie, t. LXX, mars 1911, p. 371-372.

Certains auteurs, en particulier Steensma (1), ont conseillé, pour obtenir des résultats plus probants encore, de distiller les bouillons de culture et de rechercher l'indol dans le distillat où il a passé rapidement en raison de sa volatilité. Cette manière de faire, au dire de ses partisans, a le gros avantage d'éviter la recherche de l'indol en présence de certaines substances existant dans les cultures et pouvant donner des réactions différentes se traduisant par des colorations gênantes. Elle a été critiquée par Porcher et Panisset, puis par Berthelot qui, dans l'ouvrage déjà cité, affirme que « certains milieux usuels et les solutions de certaines peptones, stériles ou ensemencées avec des microbes non producteurs d'indol, donnent, lorsqu'on les traite directement avec le réactif d'Ehrlich, des colorations très variées allant du bleu au rouge groseille, en passant par toutes les teintes du violet. » (2)

Et Berthelot conclut, comme nous l'avons déjà vu, que le meilleur procédé pour la recherche de l'indol dans les cultures est certainement celui qui consiste en l'épuisement des liquides à analyser par l'éther convenablement purifié.

Pour une même bactérie et avec des milieux identiques, la quantité d'indol produite dans une culture au bout d'un temps déterminé est d'autant plus grande que la quantité d'oxygène ou d'air libre dont peut disposer la culture est

---

(1) Steensma. Uber Farbenreaktionen der Eiweisskœrper .. mit aromatischen Aldehyden und Nitriten. *Zeitschr. f. Physiologische Chemie*, t. XLVII.

— Die Farbenreaktionen in der Biochemie. *Biochem. Zeitschr.*, t. VIII, 1908, p. 203.

(2) A. Berthelot. *Loc. cit.*, p. 854.

plus grande. C'est ce qu'ont montré Porcher et Panisset (1) en opérant d'abord avec des cultures de colibacilles, puis ensuite en expérimentant sur le B. proteus.

Ce résultat s'explique très facilement par ce simple fait que plus l'aération est parfaite, plus est intense le développement microbien et, par suite, plus grande la quantité de matière protéique attaquée. Les mêmes auteurs (2), en n'étudiant que le colibacille, ont d'ailleurs constaté ce que nous relations plus haut : que la quantité d'indol formée par une bactérie déterminée varie avec les différentes peptones employées, mais que pour une même peptone, elle est toujours proportionnelle à l'abondance de la culture.

Encore convient-il, pour que les résultats soient toujours comparables, de ne faire les cultures microbiennes que dans des milieux préparés avec une peptone convenablement choisie et autant que possible identique à elle-même, car ainsi que Feltz (3) l'a montré pour le proteus, une même race microbienne peut produire de l'indol aux dépens de certaines peptones et ne pas en donner avec d'autres, ce qui tient évidemment à la variabilité de composition des différentes peptones.

Notons maintenant, pour terminer, que la température ne semble pas avoir d'influence directe sur la production

---

(1) Porcher et Panisset. De la formation d'indol dans les cultures en milieux aérobies et en milieux anaérobies. C. R. Soc. Biologie, t. LXX, p. 436-438.

(2) Porcher et Panisset. Les diverses peptones et la formation d'indol. C. R. Soc. Biologie, t. LXX, p. 464-466.

Porcher et Panisset. Sur la recherche de l'indol dans les milieux liquides de culture. C. R. Soc. Biologie, t. LXX, p. 369-371.

(3) L. Feltz. Le Proteus Vulgaris Hauser. Thèse de pharmacie, Paris 1900.

d'indol. Nous avons fait, avec le même bouillon, des cultures de colibacille à des températures différentes, les unes à 42°, d'autres à 37°, d'autres encore à la température ambiante, 17-18°. En recherchant l'indol dans ces cultures lorsqu'elles étaient arrivées au même degré de développement — ce qu'il est facile d'apprécier par une numération approximative des germes et par un examen de la transparence du milieu — nous avons obtenu dans nos différents tubes des réactions colorantes sensiblement identiques. La température n'intervient évidemment dans la formation de l'indol qu'en favorisant ou empêchant le développement des bactéries destructrices des composés protéiques.

EXPOSÉ SOMMAIRE

des différentes réactions colorantes de l'Indol

Les réactions que l'on peut utiliser pour déceler l'indol dans les bouillons de culture sont toutes des réactions colorées dues à des combinaisons de l'indol avec le réactif employé.

Pour les mettre mieux en évidence, on peut, au lieu de traiter les dilutions d'indol assez étendues que constituent toujours les bouillons de culture — ce qui, comme nous l'avons déjà signalé, expose à des erreurs, évitables lorsqu'on s'entoure de certaines précautions — opérer sur des solutions plus concentrées obtenues soit en distillant le milieu indologène; soit, ce qui est beaucoup plus rapide et plus pratique, en utilisant la solubilité de l'indol dans l'éther, le benzol, le chloroforme et surtout l'alcool amylique.

Réaction de Salkowsky ou indol-nitreuse

Salkowsky (1) a signalé la propriété qu'a l'indol dissous dans l'eau de donner, en présence de quelques gouttes d'acide nitreux, une coloration variant du rose tendre au rouge sang. Le bouillon de culture supposé indologène sera donc traité par une petite quantité d'acide nitreux : s'il se produit une coloration rouge, on pourra affirmer la présence d'indol. La réaction est plus nette par addition d'alcool amylique qui concentre l'indol.

La plupart des auteurs s'accordent pour employer, sous le nom de réaction de Salkowsky, une variété de la réaction indol-nitreuse basée sur une propriété de l'indol décrite par Bæyer antérieurement au mémoire de Salkowsky :

Si à quelques centimètres cubes d'une solution d'indol on ajoute un centimètre cube d'une solution de nitrite de sodium à 0 gr. 20 pour 1000, puis ensuite quelques gouttes d'acide sulfurique pur, on voit se produire, par agitation, une coloration rose ou rouge suivant la teneur en indol de la solution essayée et due à la formation de nitroso-indol, combinaison de l'indol avec l'acide nitreux mis en liberté.

On peut remplacer l'acide sulfurique par l'acide azotique ou mieux encore par l'acide nitrique chargé de

(1) Salkowsky. *Zeitschrifft für physiologische Chemie*, 1888, t. VIII, p. 417.

vapeurs nitreuses et, dans ce dernier cas, supprimer l'addition de nitrite.

La réaction est assez sensible; elle le devient plus encore si l'on prend soin de chauffer légèrement le tube contenant la solution, comme le conseillent Nonotte et Demanche (1). Grubs et Francis (2) préfèrent ajouter d'abord l'acide sulfurique, puis font arriver doucement sur le mélange (H^2SO^4+indol), une solution de nitrite de soude à 1 pour 1.000 : on voit alors apparaître un anneau rouge à la surface de séparation. Nencki décrit comme plus sensible le procédé suivant : ajouter à la solution d'indol quelques gouttes d'acide acétique cristallisable, puis quelques centimètres cubes d'un mélange d'alcool et d'éther, agiter, recueillir par décantation le liquide éthéro-alcoolique qui surnage, puis l'évaporer à sec dans une capsule de porcelaine. En traitant alors le résidu par quelques gouttes d'une solution de nitrite de potasse et ensuite par l'acide sulfurique pur, on obtient une belle coloration rouge.

Ce procédé est peu pratique. Pendant très longtemps, avec notre chef, le docteur Jirou, nous avons employé au Laboratoire de bactériologie de l'Hôpital militaire de Nancy la méthode suivante, beaucoup plus simple et qui nous a donné les meilleurs résultats :

On prend 8 à 10 centimètres cubes de la solution d'indol et on y ajoute 10 gouttes d'une solution de nitrite de

---

(1) Nonotte et Demanche. Dosage de l'indol dans les cultures microbiennes. C. R. Soc. Biologie, p 658, 1908.

(2) Grubs et Francis. Ring test for Indol. *Bull. of the hygienie Laboratory*, Washington, mai 1902.

potassium à 1 pour 1000; on agite et, à la surface du mélange, on laisse couler 2 centimètres cubes environ d'acétone qui surnage, puis on laisse tomber lentement, pour éviter toute effervescence, 6 à 8 gouttes d'acide sulfurique pur; on voit se produire une coloration rose-rouge plus ou moins intense qui augmente lorsqu'on agite le tube de façon à mélanger l'acétone au reste du contenu.

Il faut avoir soin de n'employer que de l'acide sulfurique pur, bien exempt d'indol, car la plupart des acides du commerce renferment toujours de petites quantités de ce produit.

Réaction de Crisafulli (1)

Le liquide à essayer au point de vue indol est additionné de quelques gouttes d'acide chlorhydrique pur, puis on plonge dedans un petit copeau bien sec de bois de pin ou d'autre conifère; en présence d'indol, le copeau prend une coloration qui varie du rouge cerise au rouge violet. Le pyrrol donne la même réaction, mais plus écarlate.

Réaction d'Ehrlich (2) à la Paradiméthylaminobenzaldéhyde

La paradiméthylaminobenzaldéhyde en solution alcoolique à 5 % donne, avec l'indol en solution aqueuse en

---

(1) Crisafulli. La Reazione rossa del legno di pino per la ricerca dell' indo nelle culture in brodo dei microbi. *Rivista d'Igiene*, 1895, n° 5.

(2) Ehrlich. Ueber die Dimethylaminobenzoldehyd-Reaktion. *Deutsche Med. Woche*, 1901, n° 15.

présence d'acide chlorhydrique, une coloration rouge violacée intense.

Pour appliquer cette propriété à la recherche de l'indol, il est nécessaire de préparer les deux solutions suivantes :

Solution n° 1

Paradiméthylaminobenzaldéhyde.	1 gramme
Acide chlorhydrique pur	20 grammes
Alcool absolu	95 grammes

Solution n° 2

Persulfate de potasse en solution saturée dans l'eau distillée.

Il suffit de prendre 10 centimètres cubes environ de la culture à éprouver et d'y ajouter successivement 5 centimètres cubes de la solution n° 1, puis 5 centimètres cubes de la solution n° 2. On agite alors le mélange et l'on voit se produire une coloration rouge intense s'il y a de l'indol.

Cette réaction est très sensible, beaucoup plus que la réaction indol-nitreuse. Elle permet de déceler des traces d'indol, au millionnième même. Elle est encore plus nette, si au lieu d'une solution aqueuse d'indol, on emploie une solution alcoolique ou éthérée. Comme pour le procédé Salkowsky, l'addition de 1 ou 2 centimètres cubes d'alcool amylique qui concentre la matière colorante rend la réaction beaucoup plus apparente. Ici encore, la coloration fonce avec le temps; pour de très faibles quantités d'indol elle ne devient quelquefois manifeste qu'au bout de quelques heures.

La solution n° 1 à elle seule suffirait à produire la réaction. L'action intensifiante de la solution n° 2 (persulfate

alcalin) préconisée par Bœhme (1), puis par Crossinini (2), n'aurait que très peu d'importance pour Gauthier (3). Il résulte des essais que nous avons faits nous-même qu'elle est au contraire très utile, surtout pour déceler de très faibles quantités d'indol.

Réaction d'Oscar Baudisch (4)

L'auteur a cherché à obtenir une réaction d'indol plus facile à employer dans la pratique courante des laboratoires de campagne, surtout pour la recherche du vibrion cholérique dans les selles.

Il part de cultures sur gélose additionnée de nitrométhane des colonies à examiner. Il prélève la colonie suspecte au moyen d'une spatule de platine avec un peu de la gélose nutritive qui lui sert de support. Chauffé dans un tube à essai avec un peu d'alcali (potasse ou soude) dilué, rapidement refroidi à l'eau courante, additionné de quelques gouttes d'alcool amylique et d'acide chlorhydrique en excès, l'échantillon donne, s'il y a de l'indol même en très faible quantité, une belle coloration rouge ou rose à l'alcool amylique qui se sépare.

Il peut être nécessaire de réchauffer jusqu'au voisinage

---

(1) Bœhme Die Anwendung der Ehrlichen Indolreaktion für bakteriologische Zwecke. *Centralblatt f. Bakt. Original*, t. 40, p. 129.

(2) Crossinini. Uber den Nachweis von Indol in den Bakterien Kulturen mit der Ehrlichen Method. *Arch. für Hyg.*, t. 72, p. 161.

(3) Gauthier. *Loc. cit.*, p. 22.

(4) Oscar Baudisch. Uber eine neue Indolreaktion. *Zeitschr. f. physiol. Chemie*, t. XCIV, juin 1915, p. 132-135.

de l'ébullition pour obtenir une bonne séparation de l'alcool amylique.

Au lieu d'ajouter le nitro-méthane au milieu de culture avant l'ensemencement, on peut partir d'une culture sur gélose ordinaire et mêler le réactif nitro-méthane à l'alcali dilué.

Réaction de Frederick-C. Lewis (1)

L'auteur, se basant sur ce que le procédé qui consiste à employer la paradiméthylaminobenzaldéhyde en solution alcoolique acide avec un agent oxydant tel que le persulfate de potassium est infidèle et lui a donné des résultats variables avec la quantité d'indol, a préconisé une nouvelle technique qui n'est, en somme, qu'une variante de la méthode d'Ehrlich-Bœhme :

A 5 centimètres cubes de la culture, on ajoute 5 centimètres cubes du réactif aldéhydique et 1 centimètre cube de persulfate de potassium à 1 %; on laisse au contact pendant 30 minutes environ, puis on procède à l'extraction de l'indol au moyen du chloroforme qui, en cas de présence, doit se teinter en rouge.

Une meilleure technique encore, d'après Lewis, consisterait à renverser le procédé en pratiquant d'abord l'extraction de l'indol bactérien contenu dans la culture par

(1) Frederick-C. Lewis. On the detection and estimation of bacterial indol and observations on intercurrent phenomena. *Journ. of path. a. bact.*, t. XIX, janvier 1915, p. 429.

le chloroforme, puis en caractérisant cet indol en solution chloroformique par les réactifs aldéhyde et persulfate de potassium.

Réaction de Sicre et Escallon avec le furfurol

Sicre et Escallon (1) ont proposé pour la recherche de l'indol dans les bouillons de culture la réaction suivante :

A 10 centimètres cubes de la culture, on ajoute 3 à 5 centimètres cubes d'une solution récente à 1 pour 50 de furfurol dans l'alcool. On agite, puis on additionne de quelques gouttes d'acide chlorhydrique pur. Il se forme en présence de l'indol, une coloration jaune orangé qui s'accentue rapidement, d'après les auteurs, jusqu'au brun verdâtre, à mesure que l'on ajoute de l'acide.

Nous n'avons que très rarement observé cette teinte brun verdâtre et, nous servant comme dans les réactions précédemment décrites, d'alcool amylique pur pour intensifier la réaction, nous avons, dans la plupart des cas, obtenu une belle coloration rouge de l'alcool amylique ajouté, en présence d'indol.

Ce procédé est très sensible et permet, comme celui d'Ehrlich, de déceler de très faibles proportions d'indol.

Réaction de Buard (2) avec la vanilline

On prend 10 centimètres cubes de bouillon de culture à examiner, même au bout d'un séjour à l'étuve relative-

(1) Sicre et Escallon. Recherche de l'indol dans les cultures microbiennes à l'aide du furfurol. *Archives de l'Institut Pasteur de Turin*, 1909, p. 21.

(2) Buard. Recherche de l'indol dans les cultures microbiennes. C. R Soc. Biologie, t. LXV, 1908, p. 158.

ment court (quinze à vingt heures), on y ajoute 5 à 6 centimètres cubes d'alcool absolu; le mélange est alors additionné de 1 centimètre cube d'une solution alcoolique de vanilline à 0,02 % et enfin d'acide chlorhydrique pur goutte à goutte. Il faut avoir soin d'agiter après chaque addition pour bien mélanger; s'il y a de l'indol, on voit se produire une belle coloration rose, qui peut aller jusqu'au rouge orangé, se fonçant par la chaleur et pâlissant par refroidissement.

Réaction de Denigès avec l'aldéhyde cinnamique

Denigès (1), qui avait décrit le procédé précédent à la même époque que Buard, propose de remplacer la solution de vanilline par une solution d'aldéhyde cinnamique au même titre.

On obtient une teinte jaune qui va aussi en s'accentuant.

Le même auteur a d'ailleurs signalé (2) qu'un grand nombre de composés organiques pouvant produire de l'indol, en particulier les aldéhydes aromatiques et furfuroliques, ainsi que les dérivés propényliques ou allyliques, donnaient des produits colorés en présence de l'acide chlorhydrique.

L. Gauthier (3), partant de cette notion, a fait des recherches sur différents corps de cette nature : la p. dié-

(1) Denigès. Nouveaux réactifs de l'indol. C. R. Soc. Biologie, 9 février 1908.

(2) Denigès. Réactions différentielles du scatol et de l'indol. C. R. Soc. Biologie, p. 689, 1908.

(3) L. Gauthier. Recherches sur l'Indol en microbiologie. Thèse Pharmacie, Lyon, 1912, p. 24.

thylaminobenzaldéhyde, l'o. nitrobenzaldéhyde, l'aldéhyde valérianique, l'aldéhyde butylique normale, l'aldéhyde éthylique, le pipéronal, la benzaldéhyde, l'aldéhyde cuminique et le citrol.

Tous ces composés donnent avec l'indol, en présence d'acide chlorhydrique, des colorations variant du rose clair au violet.

Réaction de Konto (1) avec la formaldéhyde

Au liquide qu'on suppose contenir de l'indol, il suffit d'ajouter quelques centimètres cubes de la solution de formol du commerce à 40 %; après agitation, on additionne de quelques gouttes d'acide sulfurique concentré : il se produit, en présence d'indol, une coloration rouge violacée.

Réaction de Bitto (2) avec le nitroprussiate de soude

En ajoutant une goutte de nitroprussiate de soude à 5 % et une goutte de lessive des savonniers à la solution d'indol, on arrive, d'après Denigès (3), à déceler un milligramme d'indol dans un litre de la solution. Il se produit une coloration rouge instable qui devient bleue par addition d'acide nitrique.

---

(1) Konto, Ueber eine neue Reaktion auf Indol. *Zeitschr. f. Phys. Chem*, 1906.

(2) Bela de Bitto. Ueber das Nitroprussidnatrium als Reagens auf aldehyde und Ketone. *Ann. der Chem.*, p. 269, 1892.

(3) Denigès. Sur la recherche de l'indol par le reactif de Legal. C. R. Soc. Biol., p. 295, 1908.

Réaction avec la β naphtoquinone monosulfate de sodium

Décrite par Herter et Foster (1), puis reprise par Gorter et de Graaf (2) : à la solution d'indol très légèrement alcalinisée, on ajoute quelques gouttes d'une solution aqueuse de β naphtoquinone monosulfate de sodium; on voit se produire une belle coloration bleue qui devient rouge si l'on traite par le chloroforme.

Gorter et de Graaf conseillent d'alcaliniser avec de la potasse à 10 % et d'éviter l'emploi de l'ammoniaque, qui pourrait masquer la réaction.

Réaction de Fleig (3)

Une solution d'indol donne, avec l'aldéhyde anisique, une coloration rouge orange; avec l'aldéhyde protocatéchique, une coloration rouge éosine; avec le réactif d'Hopkins et Cole — acide glyoxylique en présence d'acide sulfurique — une coloration rouge groseille.

---

(1) Herter et Foster. On a method of determining indol. Proced of the Soc. for exp. Biol. and medic., New-York, 24 mai 1905.

— A method for the quantitative determination of indol. *Journ. of Biol. Chem.*, 1, p. 257, 1906.

— On the separation of indol from Skatol and their quantitative determination. *Journ. of Biol. Chem.*, 2, 267, 1906.

(2) Gorter et de Graaf. C. R. Soc. Biol., p. 403, 1908.

(3) Fleig. Réactions colorées du tryptophane, de l'indol, du pyrrol, du thiophène et du carbazol avec les aldéhydes aromatiques. Leur relation avec les aldéhyd-réactions des albuminoïdes. C. R. Soc. Biologie, juillet 1908.

— Les réactions furfurolique et glyoxylique des protéiques et du tryptophane appliquées à l'indol, au pyrrol, au thiophène et au carbazol. C. R. Soc. Biologie, 1908, p. 283.

L'addition d'un solvant de l'indol, en particulier l'alcool amylique, rendra évidemment la réaction plus apparente.

Procédé de Macé

« Dans un tube à essai aux trois quarts rempli de bouillon, on ajoute de l'alcool amylique pur d'indol, environ 1 centimètre cube à 1 centimètre cube et demi, de façon à obtenir une couche d'alcool de 1 à 2 centimètres de haut environ; on agite fortement et on laisse en repos quelques instants, pour permettre à l'alcool de se rassembler en partie au-dessus du bouillon. On laisse tomber l'acide nitrique en gouttes. La coloration rouge apparaît dans la partie inférieure de l'alcool et s'étend dans toute sa couche, surtout dans les gouttelettes d'alcool qui remontent à la surface.

« Cet emploi d'alcool amylique rend la réaction beaucoup plus nette et est toujours à utiliser quand la coloration n'est pas évidente. Parfois, lorsqu'il n'existe que très peu d'indol, la coloration ne devient bien manifeste qu'au bout d'un certain temps, une demi-heure à quelques heures, mais exceptionnellement. On dirait presque que l'alcool a dissous un corps indologène qui ne donne de l'indol qu'après un certain temps, au contact de l'air. » (1)

Procédé de A. Berthelot

A. Berthelot (2) part, pour la recherche de la fonction indologène du proteus, d'une eau peptonée à 2 %, préparée

(1) Macé. *Traité pratique de Bactériologie*, 6e édit., t. I, p. 336. t. II, p. 809.
(2) A. Berthelot. *Loc. cit.*, p. 855.

avec une peptone commerciale obtenue par digestion tryptique de la viande et donnant nettement, avec l'eau de brome, la réaction du tryptophane; on débarrasse cette eau peptonée des traces d'indol décelables par la diméthylaminobenzaldéhyde qu'elle peut contenir en la faisant vivement bouillir à l'air libre, afin de la réduire au cinquième, puis on rétablit le volume primitif par addition d'eau distillée et on neutralise par la soude.

On recherche l'indol dans ce milieu par le procédé suivant :

« 1° Opérer sur 10 à 15 centimètres cubes de culture; prendre la réaction de celle-ci au papier de tournesol, et, si besoin est, l'additionner de quelques gouttes de lessive de soude pour l'alcaliniser franchement;

« 2° Ajouter à la culture contenue dans un tube à essai son volume d'éther purifié spécialement : agiter doucement pendant quelques minutes, puis laisser déposer jusqu'à ce que la couche éthérée soit bien limpide, au moins dans la moitié supérieure de sa hauteur — dans le cas d'une émulsion par trop stable, disloquer celle-ci par addition de quelques gouttes d'alcool;

« 3° Avec un tube à effilure courte dont on se sert à la manière d'un tâtevin, prélever, en s'y reprenant à plusieurs reprises, quelques centimètres cubes, en prenant bien garde de n'entraîner aucune gouttelette du milieu de culture;

« 4° Aux 3 ou 4 centimètres cubes d'éther ainsi recueillis dans un tube à essai, ajouter le quart de leur volume

d'une solution de diméthylaminobenzaldéhyde à 4 %, dans l'alcool à 96°, agiter pour bien mélanger les deux liqueurs;

« 5° A l'aide d'un tube effilé, faire arriver lentement au fond du tube renfermant le mélange solution éthérée + réactif, 2 ou 3 centimètres cubes d'acide chlorhydrique. Laisser reposer cinq minutes; examiner alors le tube devant un fond blanc. La présence d'indol dans la culture examinée est caractérisée par l'apparition d'un anneau rouge légèrement violacé dans la zone de contact des deux liqueurs; lorsque la proportion d'indol est assez forte, la coloration s'étend à toute la couche inférieure. Une teinte plus violacée, une tendance vers le bleu s'accusant avec le temps est l'indice de la présence de scatol (avec le scatol seul, la teinte primitivement violette devient bleue en trente minutes) ou tout au moins d'un mélange de ce corps avec l'indol.

« Le seul point délicat réside dans la séparation de la solution éthérée, bien que, lorsqu'on opère avec soin, il soit impossible d'entraîner des gouttelettes aqueuses avec l'éther.

« Il est d'ailleurs très simple de se mettre à l'abri de toute cause d'erreur de cette sorte en agitant doucement, dans un tube étroit, les quelques centimètres cubes de liqueur éthérée avec leur volume d'eau légèrement alcalinisée par la soude; en laissant reposer pendant quelques instants, il est alors facile de puiser avec une pipette effilée une quantité suffisante de solution éthérée totalement exempte d'impuretés, capable de donner une coloration

avec le réactif d'Ehrlich. Même en prenant l'excès de précautions que je viens d'indiquer, il ne m'a jamais fallu plus de dix minutes pour rechercher l'indol dans une culture. »

CHOIX D'UN PROCÉDÉ PRATIQUE DE RECHERCHE DE L'INDOL

Toutes les méthodes que nous venons de décrire pour la recherche de l'indol sont plus ou moins compliquées, plus ou moins rapides. Si nous exceptons le procédé Berthelot, très précis et très rigoureux, et qui à ce titre constitue la méthode de choix lorsqu'il s'agit de fixer définitivement un caractère aussi important que celui de la formation d'indol par des bactéries étudiées, trois des réactions précédentes méritent surtout de retenir notre attention et, en raison de leur simplicité et de leur rapidité, sont définitivement entrées dans la pratique courante :

La réaction de Salkowsky avec le nitrite de potassium;

La réaction d'Ehrlich avec la diméthylaminobenzaldéhyde;

La réaction de Macé avec l'acide nitrique nitreux.

A laquelle accorderons-nous notre préférence ?

Evidemment à celle qui nous donnera la réaction colorante la plus caractéristique obtenue le plus rapidement possible et de la façon la plus pratique.

A ce point de vue, on peut affirmer que les trois procédés indiqués sont rangés par ordre de sensibilité croissante, le procédé d'Ehrlich étant plus sensible que celui de Salkowsky et moins sensible que celui de Macé. Ce dernier donne une coloration beaucoup plus nette, presque toujours carmin foncé, quand les deux autres donnent simplement une teinte rose ou rouge groseille très clair. Ceci résulte de toute une série d'expériences comparatives que nous avons faites sur un grand nombre d'échantillons de colibacilles.

Klieger (1), dans un travail relativement récent, avait déjà reconnu que pour la recherche de l'indol, l'emploi du procédé Ehrlich donne des résultats plus fidèles que celui de Salkowsky.

D'après lui, le procédé de Salkowsky pourrait, dans certains cas, donner une coloration rouge qui ne serait pas due à l'indol; de même l'auteur a observé parfois, avec le procédé Ehrlich, une teinte bleuâtre qui n'a rien à faire avec l'indol, mais semble due à l'emploi de certaines peptones; c'est d'ailleurs ce qu'a aussi constaté Frederick-C. Lewis (2) dans la variante du procédé Ehrlich indiquée par lui et décrite plus haut; comme l'indol ne doit pas donner de teinte bleue, cet auteur pense que l'apparition de cette coloration doit être rattachée à la peptone.

Ces faits nous ont paru étranges, car jamais, pas plus au Laboratoire d'Hygiène de la Faculté de Médecine de

---

(1) I.-J. Klieger. Observations on indol production by bacteria of the colon-typhoïd group. *Journ. of inf. dis.* t. XIV, janvier 1914, p. 81.

(2) Frederick-C. Lewis. On the detection and estimation of bacterial indol and observations on intercurrent phenomena. *Journ. of path. a bact.*, t. XIX, janvier 1915, p. 429.

Nancy que dans les autres laboratoires, nous n'avons observé cette teinte bleue; cela tient sans doute à ce que les peptones par nous employées étaient toutes de bonnes marques. M. le professeur Macé, au cours de ses longues années d'expérience, n'a jamais eu non plus l'occasion de l'observer, et il admet qu'avec une bonne peptone, essayée avant emploi, cet inconvénient ne peut pas apparaître.

La réaction de Salkowsky, dans la variante que nous avons décrite comme ayant été longtemps employée par nous au Laboratoire de l'Hôpital militaire de Nancy, nécessite l'emploi d'acide sulfurique pur qu'il n'est pas toujours très facile de se procurer, maintenant encore moins que jadis. La solution alcoolique de paradiméthylaminobenzaldéhyde de la réaction d'Ehrlich a le gros inconvénient d'un prix de revient assez élevé, fait qui n'est pas négligeable, surtout dans un laboratoire où l'on pratique journellement un grand nombre de ces recherches.

La méthode de Macé est plus simple à la fois et plus sensible, et le prix peu élevé des produits employés permet de réaliser une économie appréciable.

Pour tous ces motifs, c'est elle que nous avons définitivement adoptée et nous savons par ailleurs que beaucoup d'expérimentateurs en sont également très satisfaits.

Malheureusement, même avec cette méthode de choix — et tout ce qui va suivre s'applique aussi bien à toutes les autres méthodes décrites — on est loin d'avoir toujours la belle coloration rouge qui saute aux yeux. Si dans la plupart des cas, pour les cultures de colibacille, la réaction est très nette et presque instantanée, il arrive de

temps en temps que l'on n'obtient, même lentement, que des teintes gratifiées par Porcher de « bâtardes » rouge brunâtre, jaune brun, jaune orangé. Quelle est la signification exacte de telles colorations ? Avec notre Maître, M. le professeur Macé, et contrairement à la plupart des auteurs, nous pensons que ces teintes bâtardes doivent être considérées comme des indications formelles de la présence dans les cultures où elles se produisent, d'indol ou de composés très voisins ayant même signification quant à la conclusion que l'on doit en tirer. Toutefois, la teinte jaune franche n'est pas à attribuer à l'indol. Il y aurait là des réactions avortées, retardées et même presque empêchées pour différentes causes qui nous échappent. Nous n'avons, en effet, constaté ces teintes qu'en essayant la réaction de l'indol sur des cultures microbiennes; il n'est pas à notre connaissance qu'elles aient jamais été obtenues par des réactions chimiques entre des produits de composition moléculaire bien déterminée. Peut-être cela tient-il à la variété du microorganisme indologène et à sa façon de réagir vis-à-vis du milieu qui lui est offert : c'est du moins ce qui semblerait résulter de nos constatations; il nous est en effet arrivé fréquemment d'obtenir l'une quelconque de ces réactions bâtardes, mais toujours la même, avec des eaux de même origine, prélevées à des moments différents.

Le solvant de l'indol employé dans la méthode Macé étant l'alcool amylique, il importe de réfuter ici une opinion assez répandue, même parmi les auteurs les plus compétents : celle qui consiste à admettre qu'il est impossible de trouver de l'alcool amylique exempt d'indol.

L. Gauthier (1), dans un ouvrage déjà cité maintes fois et somme toute relativement récent puisqu'il date de 1912, écrit textuellement :

« Quant à l'alcool amylique, il n'est pas à recommander parce qu'il donne lui-même une réaction très nette avec le réactif d'Ehrlich. Avec un alcool amylique destiné à l'usage courant du laboratoire, nous avons obtenu une coloration fugace; avec un autre alcool pur, exempt de furfurol, elle était persistante. Il ne faudra donc pas perdre de vue ces considérations si l'on veut rassembler la matière colorante. »

C'est là une opinion tout à fait erronée, au même titre que celle relative à la grande difficulté de se procurer une peptone exempte d'indol. Evidemment, beaucoup d'échantillons d'alcool amylique ordinaire peuvent renfermer des traces d'indol : en effet, l'alcool amylique est extrait du produit de la distillation des moûts fermentés obtenus avec la pomme de terre préalablement saccharifiée. L'abondant développement microbien qui se fait pendant la fermentation du moût, fournit de l'indol provenant de l'attaque de matières albuminoïdes présentes dans les tubercules. Aussi les alcools amyliques insuffisamment rectifiés renferment-ils toujours de l'indol, comme l'a fait remarquer M. Macé (2). Il suffit donc de les essayer avant de les employer et de les soumettre à la distillation s'ils sont

(1) L. Gauthier. Recherches sur l'indol en microbiologie. Thèse de pharmacie, Lyon, 1912, p. 32.

(2) Macé. *Traité de Bactériologie*, 5e édition, 1904, p. 299.

reconnus impurs; mais sans recourir à ces essais, il est toujours facile de se procurer dans le commerce de l'alcool amylique pur exempt d'indol. Nous sommes très satisfait, sous ce rapport, de l'alcool amylique pur de la maison Ponlenc.

Nous venons de dire ce qu'il fallait penser des teintes diverses obtenues dans certains cas dans la recherche de l'indol. Il nous faut ajouter maintenant qu'il existe aussi des variations d'intensité, même quand on a affaire à une réaction franchement rouge. Ces variations, qui semblent bien *a priori* être sous la dépendance de la quantité d'indol libre, ne peuvent en aucune façon, comme on l'a cru longtemps, permettre de déduction quant à la quantité des bactéries indologènes agissantes, avec lesquelles elles n'ont aucun rapport : on peut très bien obtenir une coloration très foncée de l'alcool amylique pour une quantité de culture relativement pauvre en organismes, tandis que la même quantité d'une autre culture du même microbe beaucoup plus riche et de même âge ne donnera qu'une teinte rouge moins apparente. C'est un fait que nous avons remarqué très souvent et que nous ne cherchons pas à expliquer.

FONCTION INDOLOGÈNE DES BACTÉRIES

CARACTÉRISATION DES MICROBES PAR LEUR FONCTION INDOLOGÈNE

ASSOCIATIONS MICROBIENNES ET INDOL

La production d'indol par les bactéries nécessite, nous l'avons vu, la présence dans le milieu de culture d'une substance capable, en se décomposant, de fournir certains produits, en particulier l'indol. C'est le cas du tryptophane. Mais cette condition nécessaire n'est pas suffisante et en présence du tryptophane, deux microbes différents, le coli et le bacille typhique par exemple, se comporteront différemment : le premier produit de l'indol, le second n'en produit pas.

Malgré ce qu'en pense Otto Rahn, qui écrit que la production d'indol n'est pas une propriété propre à des espèces déterminées (1), la formation d'indol aux dépens d'un

(1) Otto Rahn. Statistiche studien über die system der Bakterien. *Centralbl. f. Bakt.*, II, t. XLVI, 1916.

milieu de culture donné dépend donc du microbe cultivé : elle est une propriété de l'espèce considérée, propriété spécifique au même titre que les caractères culturaux et les différentes autres réactions biochimiques du microbe. Pour une espèce indologène, elle se manifestera toujours en présence d'un milieu protéique, mais elle pourra être masquée par exemple par addition de sucre aux milieux de culture tryptophaniques. Elle existe encore dans ce cas particulier, mais il se forme entre les produits initiaux de décomposition de la molécule de tryptophane et le sucre ajouté certaines réactions qui entravent la formation de l'indol, stade ultime de cette décomposition. Pour les espèces non indologènes, l'attaque de l'acide indolamino-propionique, dérivé du tryptophane, se fait sans doute de façon différente et les produits de décomposition ne contiennent plus d'indol; ils peuvent, par contre, renfermer certains dérivés voisins, par exemple le scatol que l'on ne trouve plus du tout avec un microbe très indologène comme le colibacille.

Il résulte de là que l'absence ou la présence d'indol dans un milieu de culture à base de tryptophane constitue pour le bactériologiste un élément précieux de diagnostic de l'espèce qui cultive.

C'est Kitasato (1) qui le premier a attiré l'attention sur ce fait, en montrant toute l'importance que pouvait avoir, au point de vue de la différenciation des bactéries, la présence ou l'absence d'indol dans les milieux de culture.

---

(1) Kitasato. Die negative indol-reaktion der Typhusbazillen im gegensatz zu anderen ähnlichen Bazillarten. *Zeitschr. für Hygiene*, Band VII, 1889, p. 515.

Déjà en 1886, Poehl avait observé qu'en ajoutant quelques gouttes d'acide sulfurique pur à des cultures de choléra, il se produisait une coloration rose qui fonçait de plus en plus. Budjwid (1), l'année suivante, reprenait l'expérience et, sous le nom de choléra-roth, la décrivait comme réaction spécifique du bacille virgule.

Ce n'est que quelques années plus tard que furent identifiées ces deux réactions, choléra-roth et réaction de l'indol.

Malheureusement, il s'en faut de beaucoup que tous les auteurs soient d'accord sur la valeur spécifique de la réaction de l'indol dans la diagnose des espèces microbiennes. La plupart, il faut le reconnaître, admettent cette spécificité, mais d'autres la nient et n'accordent alors à la réaction de l'indol qu'une importance tout à fait secondaire.

« Certains colibacilles authentiques ne fournissent pas la réaction de l'indol; elle fait aussi défaut dans les milieux sucrés. Le bacille du côlon, cultivé pendant plusieurs générations sur des milieux chargés d'antiseptiques (phénol), peut perdre la propriété qu'il avait de donner de l'indol (Malvoz). Il ne faut donc pas attacher une trop grande importance à cette réaction pour différencier le coli du bacille typhique, d'autant plus que, dans certaines conditions, ce dernier est capable de la fournir nettement. » (2)

---

(1) Budjwid. Eine Chemische Reaction für die Cholera-bacterien. *Zeitschr. f. Hyg.*, II, 1887.

(2) P. Miquel et R. Gambier. *Traité de Bactériologie pure et appliquée*, p. 439.

Nous avons vu plus haut ce qu'il fallait penser de cette assertion que le bacille typhique pouvait, dans certains cas, devenir indologène et qu'il serait beaucoup plus exact de dire que dans certaines conditions (grandes quantités de milieux, etc.), l'on peut obtenir la présence de traces d'indol dans les cultures de B. typhique, cet indol venant des grandes quantités de peptone en jeu.

Il faut également faire justice de ce fait que le colibacille peut, après plusieurs générations, perdre sa propriété indologène. Nous avons en effet constaté qu'une même variété de colibacille donnait par réensemencements successifs sur un même milieu peptoné des réactions d'indol de moins en moins fortes, mais ces réactions étaient encore très sensibles après la dixième génération, et il eût fallu sans doute pousser l'expérience jusqu'à des générations beaucoup plus éloignées pour n'avoir plus de réaction appréciable. Ceci ne se produit jamais dans la pratique, surtout dans la recherche du colibacille dans l'eau; on n'en peut donc tirer aucune conclusion contre la spécificité de la formation d'indol. Il se passe là un phénomène comparable à celui qu'on observe lorsqu'on ensemence par repiquages successifs une espèce productrice de pigments; la couleur du pigment va en s'atténuant au fur et à mesure des réensemencements. Il en est d'ailleurs de même de tous les phénomènes vitaux dont la constance ne saurait être niée, mais qu'on peut arriver à voir se transformer peu à peu dans un sens déterminé. La virulence en est un exemple bien net; les autres propriétés biologiques se comportent de même. D'ailleurs, il suffit pour retrouver les caractères initiaux de ramener les individus

dans leur ambiance première : c'est ainsi que ce même colibacille dont la fonction indologène s'était passablement atténuée à la dixième génération, nous a donné par réensemencement sur bouillon simple une réaction d'indol des plus caractéristiques.

Il est donc normal de considérer la fonction indologène des bactéries comme un de leurs caractères absolument spécifique, à la condition qu'elle soit, comme il convient pour toute expérience biologique, toujours recherchée dans les mêmes conditions.

Les divergences d'appréciation des différents auteurs proviennent, à notre avis, des conditions différentes dans lesquelles ils se plaçaient et de la différence de sensibilité de leurs méthodes particulières. En adoptant une méthode unique, ces divergences disparaîtront, et avec Gauthier nous pensons qu'on ne verra plus alors de colibacilles ne produisant pas d'indol. Il n'y a pas de raison pour qu'ils n'en fabriquent pas, et si l'indol n'apparaît pas dans les cultures, on ne se trouve pas en présence de colibacilles, mais d'espèces voisines décrites comme paracolibacilles. Il est permis de raisonner ainsi pour tous les microbes qui sont nettement classés.

Partant de là, différents auteurs se sont appliqués à dresser des tableaux où se trouvent indiqué, pour la plupart des microbes les plus connus, le sens positif ou négatif de la réaction de l'indol. Le plus récent est celui établi par Gauthier dans un ouvrage déjà cité.

On remarquera combien dans ce tableau se trouvent encore de résultats inconstants : beaucoup d'espèces sont notées comme pouvant à volonté produire ou ne pas pro-

duire d'indol. Cela tient à ce que l'auteur n'a pas consigné uniquement des résultats personnels obtenus par une méthode déterminée. Forcé, pour établir une liste aussi complète que possible, de se reporter aux différents traités de bactériologie, il a de ce fait transcrit des résultats non concordants. Cette non-concordance est due, répétons-le, à ce que les méthodes employées n'étaient pas identiques, les produits provenaient d'origines différentes et les temps d'observation n'étaient pas comparables. Une autre cause d'erreur, de beaucoup la plus fréquente à notre avis, tient à ce que les chercheurs ont admis d'emblée que les espèces sur lesquelles ils opéraient étaient bien différenciées et exactement cataloguées par certains de leurs caractères, non compris la production d'indol que l'on recherchait, tandis qu'il eût fallu se montrer plus rigoureux et, renversant les données, n'admettre au titre de colibacille, par exemple, qu'une espèce à fonction indologène indiscutable.

Quoi qu'il en soit, l'accord est à peu près complet aujourd'hui sur la production d'indol par les bactéries qu'on rencontre le plus communément, tels que le colibacille et beaucoup d'espèces pathogènes. Cette faculté pour une espèce microbienne de produire ou de ne pas produire d'indol doit être regardée comme un caractère constant de l'espèce. Il y a des microbes qui, dans des conditions déterminées, fabriquent toujours de l'indol, d'autres qui n'en fabriquent jamais.

Cette application de la recherche du pouvoir indologène des bactéries à leur diagnose rend évidemment les plus grands services, mais elle n'a été envisagée jusqu'ici que pour des cultures pures. Il peut cependant arriver, et c'est

un cas fréquent dans la bactériologie des eaux, que l'on se trouve en présence de plusieurs espèces associées et que sans avoir à les isoler et à les déterminer chacune séparément, on ait intérêt à savoir s'il y a présence d'indol dans le milieu.

C'est poser le problème de l'indol dans les associations microbiennes, problème assez complexe à la vérité, puisque pour le résoudre entièrement il serait nécessaire d'envisager toutes les combinaisons possibles des différentes espèces microbiennes.

Pour nous en tenir au cadre qui nous intéresse plus spécialement, savoir l'analyse bactériologique des eaux, nous avons surtout étudié la façon dont se comporte au point de vue de l'indol le colibacille en présence des espèces que l'on rencontre le plus fréquemment à côté de lui dans la méthode des bouillons phéniqués : le B. subtilis, le B. mesentericus, etc.

Aucun de ces commensaux habituels du colibacille ne donne d'indol. Il semblerait même qu'en leur présence le coli perde presque totalement son pouvoir indologène, car la réaction est à peine apparente avec un bouillon où ont cultivé ensemble un colibacille très indologène et un B. mésentéricus par exemple.

En réalité, il ne faut voir là qu'une simple conséquence de l'antagonisme microbien: les espèces le plus fréquemment associées au colibacille dans les eaux et cultivant en milieu phéniqué à la température de 42° sont des espèces donnant par leur développement un voile parfois assez épais à la surface du bouillon de culture. Ce voile sépare de l'air le reste du milieu et entrave plus ou moins la mul-

tiplication des microbes sous-jacents, du colibacille en particulier, qui peut cependant, ne l'oublions pas, se développer sous voiles. Le coli se multipliant moins facilement, l'attaque de la molécule tryptophanique de la peptone est moins énergique et la quantité d'indol mise en liberté beaucoup moins considérable. Les matériaux nutritifs du milieu subissent une autre désintégration plus en faveur de l'espèce qui semble prendre le dessus, désintégration qui ne comporte pas la formation d'indol.

Si, en effet, on isole, comme nous l'avons fait, ces deux espèces que l'on peut taxer d'antagonistes, colibacille d'une part, et d'autre part microbe non indologène concomitant, subtilis ou autre, et si on les cultive chacune séparément, on obtient avec le mélange des deux cultures pures une réaction d'indol très nette : le colibacille a effectué son développement comme à l'ordinaire, avec forte production d'indol. Il n'existe dans l'autre culture aucune substance capable, lors du mélange, de former avec l'indol une combinaison empêchant de mettre en évidence ce dernier produit.

Il suffira donc, dans ces cas, d'une réaction très minime pour affirmer la présence du colibacille, à condition d'opérer sur de grandes quantités de bouillon, 50 à 100 centimètres cubes. Mais si l'on veut rechercher la présence du colibacille dans des quantités d'eau plus petites, en vue d'une numération exacte, il faudra, pour être certain du résultat, se débarrasser par isolement sur plaques des microbes associés au coli et qui, pour de petites quantités de ce dernier, masqueraient totalement la production d'indol.

M. Macé a observé qu'en présence du B. fœcalis alcaligenes, la formation d'indol par le colibacille pouvait ou ne pas se produire ou ne se produire que très faiblement. Ceci s'observe en particulier sur les bouillons phéniqués, dont la teinte s'est notablement éclaircie à 42° et qui donnent, par addition d'acide — d'acide sulfurique surtout — un dégagement gazeux souvent très abondant, d'odeur urineuse très nette, beaucoup de mousse. La production notable d'ammoniaque paraît être la cause inhibitrice; c'est l'attaque du carbonate d'ammoniaque par l'acide qui produit le dégagement gazeux.

Il semble qu'on soit fondé à admettre dans la façon dont se comportent les associations microbiennes au point de vue de la formation d'indol, qu'il n'y a pas d'espèces capables de jouer vis-à-vis des autres un rôle anti-indologène, s'il nous est permis de forger ce mot. Il n'y a en réalité que des espèces antagonistes en concurrence vitale, les unes indologènes, les autres non indologènes. Si par suite des circonstances ces dernières prennent le dessus, elles gênent ou entravent complètement le développement des autres avec toutes les conséquences qui s'ensuivent : diminution de l'attaque de la molécule albuminoïde par la variété indologène, moins grande quantité des substances de déchet de cette attaque et en particulier de l'indol.

CONCLUSIONS

La formation de l'indol dans les cultures est une propriété absolument spécifique de certaines espèces bactériennes. Beaucoup de méthodes ont été proposées pour la rechercher, toutes basées sur des réactions colorantes de l'indol.

A part les cas où il s'agit de recherches très minutieuses, destinées à fixer définitivement ce caractère pour des bactéries déterminées, auxquels on emploiera le procédé décrit par Berthelot, la méthode de choix pour la recherche véritablement pratique de la réaction de l'indol est la méthode Macé, à l'acide nitrique fumant et à l'alcool amylique, qui, applicable aux bouillons de cultures mêmes, rendra les plus grands services, en particulier pour la recherche du colibacille dans l'eau.

Il importe, chaque fois qu'on a à effectuer une recherche de ce genre, de n'opérer qu'avec des produits bien purifiés et essayés à l'avance, pour bien se mettre à l'abri des causes d'erreur possibles. Ces erreurs sont surtout attribuées par la plupart des auteurs à des impuretés contenues dans les peptones. M. le professeur Macé, au cours

de sa longue expérience, n'a jamais pu vérifier ce fait : se servant de peptones connues, il n'a jamais observé de réactions d'indol anormales. On ne peut, par contre, être aussi affirmatif pour l'alcool amylique, qui très souvent renferme des traces d'indol; aussi convient-il de n'opérer qu'avec un alcool amylique absolument pur.

Dans ces conditions, toute réaction d'indol bien franche (nuance rouge) avec les bouillons phéniqués à 1,25 pour 1000, employés pour la recherche du coli dans les eaux, permettra (avec les autres caractères : rapidité du trouble, odeur caractéristique, etc.), d'affirmer la présence du colibacille dans l'eau examinée; toute réaction bâtarde (jaune brun ou jaune-orangé, à l'exclusion du jaune franc), sera attribuable tout au moins à celle d'un des composants très proches de l'indol et, par suite, de signification semblable.

Vu :
Nancy, le 23 Avril 1918.
Le Président de la Thèse :
MACÉ.

Vu :
Nancy, le 23 Avril 1918.
Le Doyen :
E. MEYER.

Vu et permis d'imprimer,
Nancy, le 24 Avril 1918.
Le Recteur de l'Académie :
Ch. ADAM,
Membre de l'Institut

BIBLIOGRAPHIE

Baudet (E.-A.-R.-F.). — Indol-Reaktion bei Proteusbacillen (*Folia Microbiologica*, Band II, Heft 3, 7 mars 1914).

Baudisch (Oscar). — Ueber eine neue Indolreaktion (*Zeitschr. f. physiol., Chemie*, T. XCIV, juin 1915).

Bela de Bitto. — Ueber das Nitroprussidnatrium als Reagens auf Aldehyde und Ketone (*Ann. der Chemie*, 1892).

Berthelot (Albert). — Recherches sur le Proteus vulgaris (*Ann. de l'Institut Pasteur*, T. XXVIII, 1914).

— Application d'une peptone protéolytique de viande et muqueuse intestinale à la préparation des milieux de culture (C. R. de la Soc. de Biologie, 17 mars 1917).

— Recherches sur quelques caractères spécifiques du Proteus vulgaris (C. R. de la Soc. de Biologie, T. LXXIV, 15 mars 1913).

— Recherches sur le Proteus vulgaris considéré comme producteur d'indol (C. R. de l'Académie des Sciences, tome CLVI, 24 février 1913).

Bœhme. — Die Anwendung der Ehrlichen Indolreaktion für bakteriologische Zwecke (*Centralbl. f. Bakter*, Original, T. XL).

Buard. — Recherche de l'Indol dans les cultures microbiennes (C. R. de la Soc. de Biologie, T. LXV, 1908).

Budjwid. — Eine Chemische Reaktion für die Cholera-Bakterien (*Zeitschr. f. Hyg.*, II, 1887).

Crisafulli. — La reazione rossa del legno di pino per la ricerca dell' indo nelle culture in brodo dei microbi (*Rivista d'Igiène*, 1895, n° 5).

Crossinini. — Ueber den Nachweis von Indol in den Bakterienkulturen mit der Ehrlichen Method (*Arch. f. Hyg.*, T. LXXII).

Denigès. — Nouveaux réactifs de l'indol (C. R. de la Soc. de Biologie, 4 février 1908).

— Réactions différentielles du Scatol et de l'Indol (C. R. de la Soc. de Biologie, 1908).

— Sur la recherche de l'indol par le réactif de Legal (C. R. de la Soc. de Biologie, 1908).

Distaso (A.). — La formation de l'indol dans le milieu sérum digéré et dilué (C. R. de la Soc. de Biologie, T. LXXX, 3 mars 1917).

Dobrowski. — Des microbes producteurs de phénol (*Ann. de l'Institut Pasteur*, T. XXIV, juillet 1910).

Ehrlich. — Ueber die Dimethylaminobenzaldehyd-Reaktion (*Deutsche Med. Wochenschrifft*, T. XV, 1901).

Feltz (L.). — Le Proteus vulgaris Hauser (Thèse de Pharmacie, Lyon, 1900).

Fischer (A.). — Hemmung der Indolbildung bei Bakt. Coli in Kulturen mit Zuckerzusatz (*Biochem. Zeitschr.*, T. LXX, 12 juillet 1915).

Fleig. — Réactions colorées du tryptophane, de l'indol, du pyrrol, du thiophène et du carbazol avec les aldéhydes aromatiques ; leurs relations avec les aldéhyd-réactions des albuminoïdes (C. R. de la Soc. de Biologie, juillet 1908).

— Les réactions furfurolique et glyoxylique des protéiques et du tryptophane, appliquées à l'indol, au pyrrol, au tyophène et au carbazol (C. R. de la Soc. de Biologie, page 283, 1908).

Garnier (L.). — *Chimie médicale* (Rueff et Cie. Ed. Paris 1915).

Gauthier (L.). — Recherches sur l'Indol en microbiologie (Thèse de Pharmacie, Lyon, 1912).

GORINI (C.): — Circa l'influenza della qualita del peptone sulle funzione batteriche (*Policlinico*, 1916).

GRIMBERT (L.). — De l'unification des méthodes de culture en bactériologie (*Arch. de parasitologie*, T. I, n° 2, 1898).

— Diagnostic des bactéries par leurs fonctions biochimiques (*Arch. de parasitologie*, T. VII, n° 2, 1903).

GRUBS et FRANCIS. — Ring test for indol (*Bull. of the hygienic Laboratory*, Washington, mai 1902).

HERTER (C.-A.). — On indolacetic acid (*Journ. of. biological Chem.*, T. IV, 1908).

HERTER et FOSTER. — On a method of determining indol (*Proced. of the Soc. for Exp. Biol. and Medic.*, New-York, 24 mai 1905).

— A method for the quantitative determination of indol (*Journ. of biological Chem.*, T. I, 1906).

— On the separation of indol from Skatol and their quantitative determination (*Journ. of biological Chem.*, T. II, 1906).

HERZFELD (E.) et KLINGER (R.). — Quantitative Untersuchungen über den Indol — und Tryptophanumsatz der Bakterien (*Centralbl. f. Bakter.* I. Orig. T. LXXVI, f. 1, 14 mai 1915).

KLIEGER (I.-J.). — Observations on indolproduction by bacteria of the Colon-typhoïd group (*Journ. of inf. dis.*, T. XIV, Janvier 1914).

KONTO. — Ueber eine neue Reaktion auf Indol (*Zeitschr. f. Phys. Chem.*, 1906).

KITASATO. — Die negative Indol-Reaction der Typhusbazillen im Gegensatz zu anderen änlichen Bazillarten (*Zeitschr. f. Hygiene*, Bd VII, 1889).

LEWIS (Frederic-C.). — On the detection and estimation of bacterial indol and observations on intercurrent phenomena (*Journ. of. path. a. bact.*, T. XIX, Janvier 1915).

MACÉ (E.). — Traité pratique de Bactériologie (6e édition, 1913).

Miquel (P.) et Gambier (R.). — Traité de Bactériologie pure et appliquée.

Miranda (F.-V.). — Recherches biochimiques sur deux races de « Proteus vulgaris Hauser » (Thèse de Sciences, Paris, 1917).

Nonotte et Demanche. — Dosage de l'indol dans les cultures microbiennes (C. R. de la Soc. de Biologie, 1908).

Pérépélizyn (N.). — La réaction du tryptophane et son application en bactériologie (*Arch. des Sciences biologiques de Petrograd*, T. XIX, n° 2).

Porcher (Ch.). — Des corps indologènes dans l'urine (C. R. de l'Académie des Sciences, 3 mai 1909).

Porcher et Nicolas. — Cours de chimie organique et biologique (2e édition).

Porcher et Panisset. — Recherche de l'indol dans les bouillons microbiens (C. R. de la Soc. de Biologie, 24 août 1909).

— Des composés indologènes dans les cultures liquides (C. R. de l'Académie des Sciences, 17 mai 1909).

— Sur la recherche de l'Indol dans les milieux liquides de culture (C. R. de la Soc. de Biologie, T. LXX, mars 1911).

— Sur la rapidité d'apparition de l'indol dans les cultures microbiennes (C. R. de la Soc. de Biologie, T. LXX, mars 1911).

— De la formation d'indol dans les cultures en milieux aérobies et en milieux anaérobies (C. R. de la Soc. de Biologie, T. LXX, mars 1911).

— Les diverses peptones et la formation d'indol (C. R. de la Soc. de Biologie, T. LXX, mars 1911).

Rahn (Otto). — Statistiche Studien über die Systeme der Bakterien (*Centralbl. f. Bakter*, II, T. XLVI, 1906).

Raybaud. — La réaction indolnitreuse dans les cultures de matières fécales en l'absence de vibrions cholériques (C. R. de la Soc. de Biologie, T. LXIX, Décembre 1910).

ROCHAIX et DUFOUR. — Remarques sur la réaction du neutral-rot (C. R. de la Soc. de Biologie, T. XIX, 20 octobre 1910).

— Contribution à l'étude des urobactéries (C. R. de la Soc. de Biologie, T. LXIV, novembre 1910).

SEIDELIN et LEWIS (Fr.). — Some notes on indol-reaction and allied phenomena (*Journal of Hygiene*, Décembre 1911).

SELTER. — Ueber Indolbildung durch Bakterien (*Centralbl. f. Bakter.* I. Origin., T. LI, 25 septembre 1909).

SICRE et ESCALLON. — Recherche de l'indol dans les cultures microbiennes à l'aide du furfurol (*Arch. de l'Institut Pasteur de Tunis*, 1909).

STEENSMA. — Ueber den Nachweis von Indol in Bakterienkulturen (*Centralbl. f. Bakter*, Origin., Bd XLI, mai 1916).

— Ueber Farbenreaktion der Eiweiskörper.... mit aromatischen Aldehyden und Nitriten (*Zeitschr. f. phys. Chemie*, Bd XLVII).

— Die Farbenreaktionen in der Biochemie (*Biochem. Zeitschr.* Bd VIII, 1908).

TROOST et PÉCHARD. — Traité de Chimie élémentaire.

VINCENT. — Sur la signification du Bacillus Coli dans les eaux potables (*Ann. de l'Institut Pasteur*, T. XIX, 1905).

TABLE DES MATIÈRES

	Pages
Avant-Propos	1
Généralités sur l'Indol	1
La Production d'Indol par les Bactéries	4
Exposé sommaire des différentes Réactions colorantes de l'Indol	21
Choix d'un Procédé pratique de Recherche de l'Indol	36
Fonction indologène des Bactéries. — Caractérisation des Microbes par leur Fonction indologène. — Associations microbiennes et Indol	42
Conclusions	51
Bibliographie	53